

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



**Michaela Hrášková**

Úloha proteinu Erv14 v buňkách kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*

The role of Erv14 protein in cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Klára Papoušková, Ph.D.

Praha, 2016

## **Poděkování**

Děkuji zejména své školitelce, Mgr. Kláře Papouškové, Ph.D., za její rady, ochotu a nekonečnou trpělivost při vedení této práce. Dále bych ráda poděkovala své rodině za veškerou podporu při studiu.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 27. 4. 2016

Podpis:

## **Abstrakt**

Cílem této bakalářské práce je shrnout veškeré dosud zveřejněné poznatky o roli proteinu Erv14 v buňkách kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Protein Erv14 funguje jako receptor pro náklad („cargo“) v endoplazmatickém retikulu (ER), kde umožňuje zainkorporování některých transmembránových proteinů do váčků COPII, čímž je umožněn jejich transport do Golgiho aparátu. V *S. cerevisiae* bylo nalezeno mnoho proteinů, jejichž transport z ER je závislý na přítomnosti Erv14. V buňkách postrádajících Erv14 jsou tyto proteiny zadržovány v ER a nemohou plnit své funkce. Mezi tyto proteiny patří např. Axl2, který je nezbytný pro axiální pučení, Sma2, díky němuž je zajištěna normální tvorba prosperové membrány během sporulace, katalytická podjednotka chitin syntázy III, Chs3, významná pro syntézu chitinu, a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+/\text{H}^+$  antiporter plazmatické membrány Nha1 účastníci se v buňkách udržování homeostáze kationtů alkalických kovů. O významu funkce proteinu Erv14 vypovídá i skutečnost, že homology tohoto proteinu byly nalezeny i v dalších organismech, a to jak v říši živočichů, včetně člověka, tak v říši rostlin.

**Klíčová slova:** Erv14, cargo receptor, váčky COPII, transport, *Saccharomyces cerevisiae*

## **Abstract**

The aim of this bachelor thesis is to summarize all published findings about the role of the Erv14 protein in the cells of *Saccharomyces cerevisiae*. The Erv14 protein works as a cargo receptor in the endoplasmic reticulum (ER), allowing an incorporation of selected trans-membrane proteins to the COPII vesicles, by which their transport to the Golgi apparatus is allowed. Many proteins were identified in the cells of *S. cerevisiae*, their transport from the ER depends on the presence of the Erv14 protein. In cells lacking Erv14, these proteins are retained in the ER and are not able to fulfil their functions. One of those proteins is for example Axl2, necessary for axial budding, Sma2, which ensures the standard formation of the prospore membrane during sporulation, the catalytic subunit of the chitin synthase III, Chs3, important for chitin synthesis, and plasma membrane Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter Nha1 participating in the maintenance of cell alkali-metal-cation homeostasis. The importance of the Erv14 protein's function is proven by the fact that its homologs were also found in other organisms, such as animals, including human, as well as in plants.

**Keywords:** Erv14, cargo receptor, COPII vesicles, transport, *Saccharomyces cerevisiae*

## Seznam zkratek

ATP	adenosintrifosfát
ATPáza	enzym katalyzující hydrolýzu adenosintrifosfátu
Cargo receptor	receptor pro náklad
COPI	coat proteins I
COPII	coat proteins II
CSI, CSII, CSIII	chitin syntáza I, II a III
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EE	časné endozomy
ER	endoplazmatické retikulum
ERES	endoplasmic reticulum exit sites
Fenotyp <i>bst</i>	fenotyp „bypass of sec thirteen“
GA	Golgiho aparát
GAP	GTPase - activating protein
GEF	guanine nucleotide exchange factor
Geny <i>SEC</i>	geny kódující sekreční proteiny
GFP	green fluorescent protein
GPI – proteiny	proteiny kotvící v membráně pomocí glykosylfosfatidylinositolové kotvy
GTP	guanosintrifosfát
GTPáza	enzym katalyzující hydrolýzu guanosintrifosfátu
kD	kilodalton
komplex LEP	komplex „leading edge protein“
lokus <i>MAT</i>	lokus „mating type“
MVB	multivesikulární tělíska
PAIRS	pairing analysis of cargo receptors
P <sub>i</sub>	anorganický fosfát
PM	plazmatická membrána
PSM	prosporová membrána
t – SNARE	target SNARE protein

## Obsah

1	Úvod .....	1
2	Sekreční dráha .....	2
3	Váčky COPII .....	4
3.1	Základní struktura .....	4
3.2	Cargo receptory .....	5
3.3	Závislost struktury COPII na transportovaném nákladu .....	7
4	Protein Erv14 .....	8
4.1	Vlastnosti proteinu Erv14 .....	8
4.2	Funkce proteinu Erv14 .....	9
4.2.1	Erv14 jako adaptorový protein .....	9
4.2.2	Erv14 jako element ovlivňující tvorbu váčku .....	11
4.3	Vliv proteinu Erv14 na axiální pučení buněk .....	11
4.3.1	Výběr místa pučení za fyziologických podmínek .....	11
4.3.2	Výběr místa axiálního pučení .....	12
4.3.3	Úloha proteinu Erv14 v axiálním typu pučení .....	13
4.4	Vliv proteinu Erv14 na sporulaci .....	14
4.4.1	Podmínky sporulace a její průběh .....	14
4.4.2	Úloha proteinu Erv14 při tvorbě prosoporové membrány .....	14
4.5	Vliv proteinu Erv14 na tvorbu chitinu .....	16
4.6	Vliv proteinu Erv14 na citlivost k solím .....	17
4.6.1	Udržování homeostáze kationtů alkalických kovů .....	17
4.6.2	Vliv proteinu Erv14 na transportér Nha1 .....	19
4.7	Homology proteinu Erv14 u ostatních eukaryot .....	21
5	Závěr .....	22
	Seznam použité literatury .....	22

# 1 Úvod

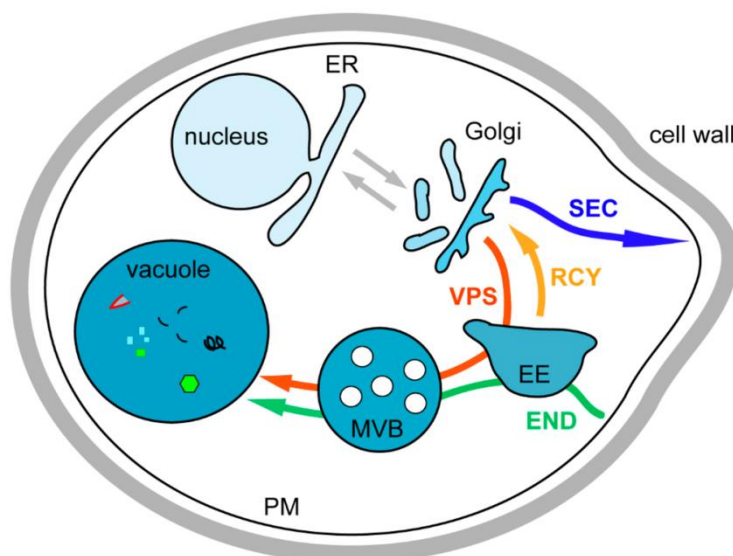
*Saccharomyces cerevisiae* je kvasinka patřící mezi vřeckovýtrusné houby (*Ascomycota*), která se díky své schopnosti zkvašovat cukry využívá v potravinářském průmyslu při výrobě piva, na základě čehož byla také pojmenována. Její název je odvozen od její vysoké afinity k cukru (*Saccharo-*), příslušnosti k říši houby (*-myces*) a využívání v pivovarnictví neboli „cervoise“ (*cerevisiae*). Využívá se ale i v dalších odvětvích potravinářského průmyslu, jako je výroba chleba, vína či octa. Nezastupitelný význam má i ve farmaceutickém průmyslu nebo při výrobě bioethanolu, který je využíván jako palivo.

*S. cerevisiae* je jednobuněčný eukaryotní organismus v mnoha ohledech podobný buňkám vyšších eukaryot, a proto se využívá také ve vědě. Mezi další vlastnosti, proč je ideálním modelovým organismem, patří její krátká generační doba, kdy při růstu buněk v médiu bohatém na živiny dojde k jejich zdvojení jednou za 1,5 hodiny. Navíc kvasinkové buňky mohou stabilně růst buď jako haploidi a nebo diploidi a mohou se také uchovávat po dlouhou dobu zamražené v glycerolu při -80 °C. *S. cerevisiae* byla prvním eukaryotním organismem, jehož genom byl kompletně osekvenován (Goffeau et al., 1996). V jádře se nachází 16 chromozomů, které nesou více než 6000 genů. Dnes je dostupných mnoho rychlých a snadných metod k manipulaci s genomem *S. cerevisiae* a zároveň může být do buněk vnesena genetická informace ve formě plasmidu. *S. cerevisiae* přispěla k objevu mnoha významných fyziologických pochodů, jako je metabolismus lipidů, buněčná signalizace, membránový transport, mitochondriální import a sekreční dráha.

Za popis sekreční dráhy, jejíž součástí je i protein Erv14, kterému se věnuje tato bakalářská práce, byla v roce 2013 Randymu Schekmanovi udělena Nobelova cena za fyziologii a medicínu. Syntéza většiny proteinů začíná na cytosolických ribozomech a to, kam který protein bude dále transportován, závisí na adresových sekvencích daných proteinů. Pokud tuto sekvenci nemají, pak zůstávají v cytosolu, kde plní svou funkci. Proteiny určené do endoplazmatického retikula (ER), Golgiho aparátu (GA), endozomů, vakuoly, plazmatické membrány nebo ven z buňky jsou transportovány do místa svého určení tzv. sekreční dráhou. Randy Schekman a Peter Novick objevili teplotně senzitivní mutované kmeny *S. cerevisiae*, neschopné sekrece proteinů (mutanti *sec*) (Novick and Schekman, 1979). Později identifikovali 23 genů *SEC*, jejichž produkty jsou důležité pro regulaci transportu proteinů v určitých fázích sekreční dráhy a při jejichž mutaci je sekreční dráha blokována v místě, kde schází daný funkční protein (Novick et al., 1981; Novick et al., 1980). Tyto objevy umožnily identifikovat důležité regulační body sekreční dráhy.

## 2 Sekreční dráha

V sekreční dráze dochází v eukaryotických buňkách k syntéze, úpravě a transportu rozpustných i membránových proteinů, které jsou určeny buď do endoplazmatického retikula (ER), Golgiho aparátu (GA), vakuoly, cytoplazmatické membrány (PM), buněčné stěny nebo do extracelulárního prostoru (Obr. 1) (shrnutí v Barlowe and Miller, 2013; Hou et al., 2012).



**Obr. 1: Transport proteinů v rámci kvasinkové buňky.** Proteiny transportované sekreční dráhou jsou z endoplazmatického retikula (ER) transportovány do Golgiho aparátu (GA). Z GA jsou některé z nich, určené do extracelulárního prostoru nebo do cytoplazmatické membrány (PM), dále přepravovány ve váčcích, které splývají s PM (SEC). Jiné proteiny jsou určeny do vakuoly, kam jsou transportovány přes časné endozómy (EE) a multivesikulární tělíska (MVB) dráhou nazvanou vacuolar protein sorting (VPS). Proteiny z PM jsou procesem endocytózy zabaleny do váčků a transportovány endocytickou dráhou (END) do EE, kde jsou tříděny na ty, které budou degradovány ve vakuole a na ty, které nejsou určeny k degradaci a recyklační dráhou (RCY) jsou transportovány do GA (převzato z Feyder et al., 2015).

Tyto proteiny jsou nejprve kotranslačně nebo posttranslačně transportovány do ER, kde dochází k jejich modifikacím a skládání. V ER jsou některé proteiny glykosylovány na aminokyselině asparagin (N – glykosylace) či serin nebo threonin (O – glykosylace) a dochází zde ke skládání proteinů za pomoci chaperonů, včetně tvorby disulfidických můstků mezi cysteiny. K jiným proteinům je připojována glykosylfosfatidylinositolová (GPI) kotva, pomocí které jsou připojeny k membráně. Správně sbalené proteiny jsou koncentrovány do specializovaných míst ER, nazvaných ER exit sites (ERES), odkud jsou přepravovány ve váčcích COPII do GA. V GA dochází k dalším úpravám, mezi které patří prodlužování

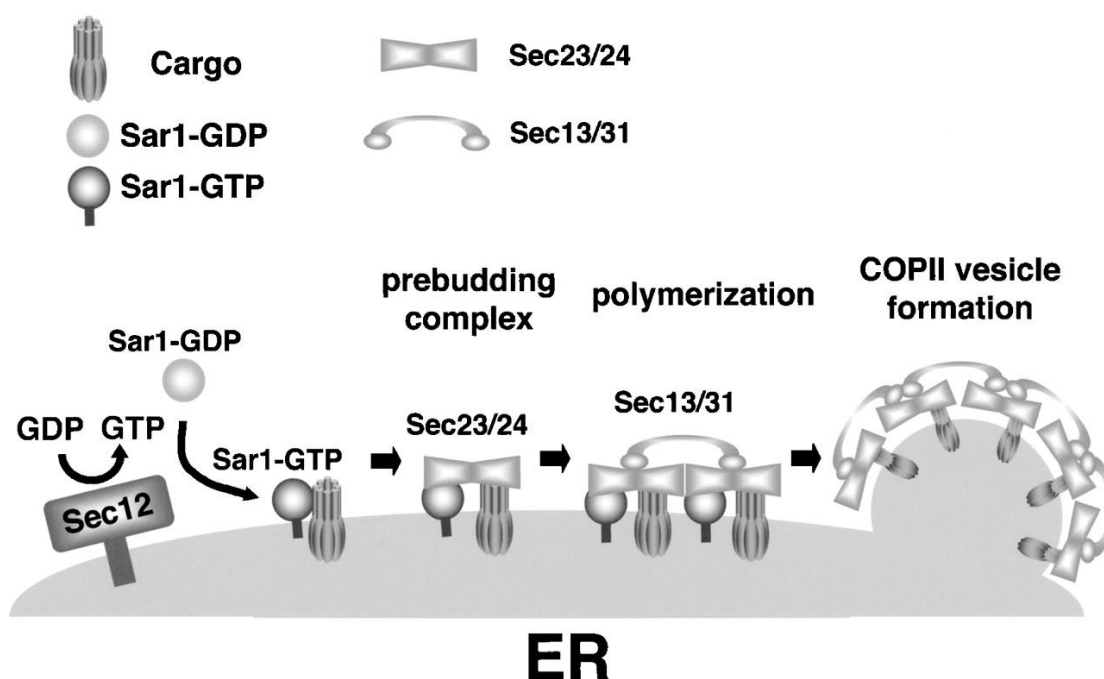


cukerných řetězců N a O - glykosylovaných proteinů pomocí mannosyltransferáz, případně štěpení proteinů. Štěpení má za následek maturaci proteinů, aktivaci jejich katalytické aktivity nebo změnu konformace, která umožní navázání k požadovanému buněčnému receptoru. GA je hlavní místo, kde se rozhoduje o dalším osudu proteinů. Proteiny patřící do ER jsou zabalovány do váčků COPI a transportovány zpět. Proteiny, jejichž funkce je realizována v GA, mají speciální sekvenci, díky které nejsou transportovány dále z GA. Ostatní proteiny jsou transportovány ve váčcích do místa svého určení (shrnutí v Barlowe and Miller, 2013; Hou et al., 2012).

### 3 Váčky COPII

#### 3.1 Základní struktura

Váčky COPII jsou součástí sekreční dráhy a jejich úkolem je transport nákladu z ER do GA. Jejich tvorba je iniciována přikládáním proteinů, nazývaných komplex COPII, na membrány ER. Některé proteiny, jako právě komplex COPII, jsou nutnou součástí každého váčku a jiné jsou začleňovány pouze při transportu specifického nákladu. Do komplexu COPII patří proteiny Sar1, Sec23, Sec 24, Sec 13 a Sec 31 (Obr. 2). Jejich postupným přikládáním k nově vznikajícímu váčku je zajištěna koncentrace nákladu do váčku, zakřivení membrán, uvolnění váčku z ER a nakonec po vypuštění i vlastní odstranění těchto proteinů z vypuštěného váčku před splnutím s membránami GA (shrnutí v D'Arcangelo et al., 2013).



Obr. 2: Tvorba váčku COPII a jeho vypuštění (převzato ze Sato, 2004).

Pučení váčku začíná aktivací GTPázy Sar1 přes její GEF (guanine nucleotide - exchange factor), Sec12, lokalizovaný v membráně ER (Barlowe and Schekman, 1993). GTPáza Sar1 po navázání GTP změní konformaci, odkryje se  $\alpha$ -helix na jejím N - konci, pomocí něj se zakotví do membrány ER a iniciuje tak její zakřívování (Lee et al., 2005). S navázaným GTP se zvyšuje její afinita k proteinu Sec23, který je rekrutován do nově vznikajícího váčku.

Sec23 je GAP (GTPase – activating protein) GTPázy Sar1 (Yoshihisa et al., 1993). Guanidinová skupina argininu 722 tohoto proteinu interaguje s negativně nabitými fosfáty katalytického místa

GTPázy Sar1 a neutralizuje je, což vede ke zvýšení katalytické aktivity Sar1 (Bi et al., 2002). Hydrolýza GTP GTPázou Sar1 stimuluje oddělení váčku od membrány ER (Bielli et al., 2005; Lee et al., 2005) a poté i uvolnění obalových proteinů z povrchu váčku (Antonny et al., 2001).

Sec23 vytváří dimer s dalším proteinem, Sec24 (Bi et al., 2002). Sec24 slouží jako cargo receptor (Miller et al., 2002), který buď navazuje přímo přepravovaný protein (Miller et al., 2003; Mossessova et al., 2003), nebo interaguje se specifickým cargo receptorem daného proteinu (Powers and Barlowe, 2002). Bylo dokázáno, že má kromě funkce cargo receptoru i vliv na formování samotného váčku (Kung et al., 2012). Pokud má buňka mutovaný gen kódující protein Sec24, pak váže méně proteinu Sec16. Ten je nutný ke snížení GTPázové aktivity Sar1 a tím k regulaci tvorby váčku.

Protein Sec23 dále zprostředkovává vazbu komplexu Sec13/31, který tvoří vnější plášť váčku (Bi et al., 2007). Sec13 zajišťuje hlavně pevnost komplexu a správné zakřivení váčku (Copic et al., 2012), zatímco Sec31 je důležitý hlavně pro vlastní skládání váčku, protože zvyšuje GTPázovou aktivitu Sar1 (Antonny et al., 2001). Aby však takto mohl působit, musí se navázat na komplex Sec23 a Sar1. Sám o sobě, bez navázaného Sec23 na Sar1, tento efekt nemá (Bi et al., 2007). Vazba Sec23 na komplex Sec13/31 je možná na dvou různých místech (Bhattacharya et al., 2012). Výběrem vazebného místa je zároveň ovlivněna i orientace Sec24, který může správně navázat daný náklad. Výběr vazebného místa tedy ovlivní konformaci váčku.

### 3.2 Cargo receptory

Nově vzniklé proteiny určené pro průchod sekreční dráhou jsou selektivně zabalovány na membránách ER do váčků COPII a transportovány dále do GA (Barlowe et al., 1994). Tato selekce může probíhat díky přímé interakci cytosolické části daného proteinu s podjednotkami váčku COPII, proteinovým dimerem Sec23/Sec24 (Miller et al., 2002). Některé proteiny se ale nemohou přímo vázat na podjednotky váčku COPII a vyžadují k tomu speciální adaptorový protein, nazvaný cargo receptor. Ten naváže náklad a sám se stane součástí nově vznikajícího váčku (Powers and Barlowe, 2002). Permeázy aminokyselin vyžadují k zabudování do váčku protein Shr3, ten však zůstává lokalizován v membránách ER (Herzig et al., 2012; Kuehn et al., 1996).

Metoda nazvaná PAIRS (pairing analysis of cargo receptors) slouží k identifikaci nákladu a jeho cargo receptoru (Herzig et al., 2012). Při této metodě mají buňky deletovaný gen kódující cargo receptor a fluorescenčně značený možný náklad. Pokud je fluorescenčně značený protein opravdu nákladem daného cargo receptoru, pak je v buňkách postrádajících příslušný cargo receptor tento protein zadržován v ER, což je viditelné při použití fluorescenčního mikroskopu.

Jednotlivé cargo receptory lokalizované v ER *S. cerevisiae* a proteiny, jejichž transport na nich závisí, jsou shrnuty v tabulce č. 1.

<b>Cargo receptor</b>	<b>Předpokládaný náklad</b>	<b>Zdroj</b>
Erv14	Axl2 Sma2 Gap1, Hxt1, Hxt2, Mid2 Ato3, Cdc50, Dnf1, Dnf2, Drs2, Ftr1, Hxt2, Hxt3, Hxt5, Hxt6, Mep2, Mid2, Nha1, Pdr12, Qdr2, Rsn1, Sec22, Snq2, Ser7, Tcb2, Tpo4, Ylr413w, Cps1, Tna1, Nha1 Chs3	(Powers and Barlowe, 1998, 2002) (Nakanishi et al., 2007) (Castillon et al., 2009) (Herzig et al., 2012) (Sacristan et al., 2013)
Erv15	neznámý	
Erv26	Pro-ALP Ktr3 Cre2, Mnn5 Kre2, Ktr1	(Bue et al., 2006; Inadome et al., 2005; Noda and Yoda, 2010) (Herzig et al., 2012) (Noda et al., 2014)
Erv29	CPY, PrA a gp $\alpha$ f Mam3, Pry1, Ear1 Rny1	(Belden and Barlowe, 2001; Caldwell et al., 2001) (Herzig et al., 2012) (Shcherbik, 2013)
komplex Erv41- Erv46	Gls1, Fpr2 Ktr4	(Otte et al., 2001) (Noda et al., 2014)
komplex p24 (Emp24, Erv25, Erp1, Erp2)	GPI - proteiny	(Castillon et al., 2009; Muniz et al., 2000; Schimmoller et al., 1995)
Emp46/47	Glykoproteiny Ssp120	(Sato and Nakano, 2002) (Herzig et al., 2012)
Shr3	Permeázy aminokyselin	(Herzig et al., 2012; Kota et al., 2007; Kuehn et al., 1996; Ljungdahl et al., 1992)
Chs7	Chs3	(Trilla et al., 1999)
Gsf2	Transportéry cukrů	(Sherwood and Carlson, 1999)
Pho86	Pho84	(Lau et al., 2000)

**Tab. 1: Cargo receptory a proteiny, se kterými interagují** (převzato z Herzig et al., 2012 a doplněno o pozdější objevy).

Zdá se, že některé cargo receptory rozpoznávají pouze určitou skupinu proteinů (Herzig et al., 2012). Například všechny dosud objevené proteiny, jejichž transport je závislý na komplexu p24, jsou GPI – proteiny (Castillon et al., 2009; Muniz et al., 2000; Schimmoller et al., 1995). Stejným případem je i cargo receptor Shr3, který rekrutuje do váčku COPII pouze permeázy aminokyselin (Herzig et al., 2012; Kota et al., 2007; Kuehn et al., 1996; Ljungdahl et al., 1992) či cargo receptor Gsf2, jehož

nákladem jsou pouze transportéry cukrů (Sherwood and Carlson, 1999). U Erv14 je rozpoznávání nákladu dáno pravděpodobně strukturou přepravovaných proteinů (kap. 4.2.1) (Herzig et al., 2012). Naopak u cargo receptoru Erv29 nebylo navrženo žádné pravidlo, na základě kterého by rekrutoval proteiny do váčku, protože proteiny na něm závislé jsou jak rozpustné, tak membránové a nalézají se v různých organelách (Belden and Barlowe, 2001; Caldwell et al., 2001).

### 3.3 Závislost struktury COPII na transportovaném nákladu

Přepravované proteiny nejsou jen pasivní pasažéři, ale fungují jako aktivní součást tvorby váčku (Manzano-Lopez et al., 2015). Jak bylo popsáno výše, protein Sec13 je základní součástí struktury váčku COPII. Pokud buňky nenesou gen *SEC13*, nejsou životaschopné (Kaiser and Schekman, 1990). Bylo však zjištěno, že vytvoření některých dvojitéch mutantů vede k životaschopnosti těchto buněk. Tento fenotyp byl nazván jako „bypass of Sec13“ (*bst*). Pokud geny *BST* nejsou přítomny, může váček COPII vypučet i v nepřítomnosti proteinu Sec13 (Elrod-Erickson and Kaiser, 1996). Mutanti *bst* jsou hlavně buňky neobsahující proteiny komplexu p24 (Tab. 1) a proteiny kotvící v membráně pomocí GPI kotvy (GPI – proteiny), dále fenotyp *bst* vykazují i buňky s delecí *ERV29* (Tab.1)(Copic et al., 2012). Jak proteiny komplexu p24, tak GPI – proteiny mají společné asymetrické umístění na membráně, přičemž jejich velká část směřuje do lumen ER. Erv29 se stává po navázání nákladu také asymetrickým. Předpokládá se, že toto rozložení proteinů ovlivňuje zakřivení membrán, které jsou pak zakřivené v protisměru pučení váčku. V přítomnosti takových proteinů je vyžadován pro tvorbu váčku COPII protein Sec13, který podporuje správné zakřivení membrány nutné pro vypuštění váčku (Copic et al., 2012). Fenotyp *bst* ovlivňuje i přítomnost či nepřítomnost proteinu Erv14, což bude podrobněji rozebráno v kapitole 4.2.2.

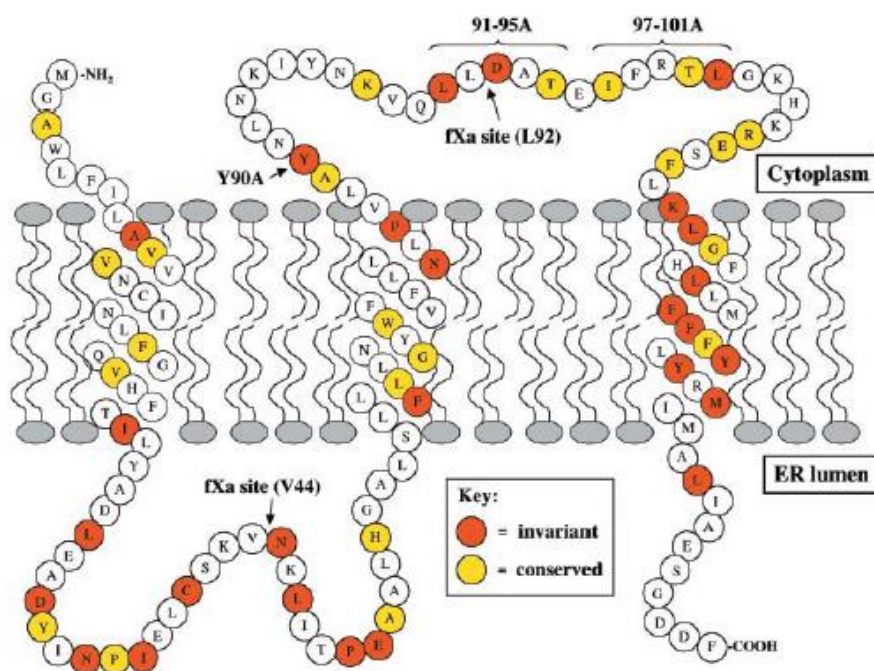
To, z jakých proteinů bude váček COPII složen, je závislé i na přepravovaném nákladu. Příkladem může být transport GPI – proteinů, při kterém se mění požadavek na přítomnost proteinu Sec24 (kap. 3.1). Genom *S. cerevisiae* obsahuje gen kódující paralog proteinu Sec24, Lst1 (Roberg et al., 1999). Bylo zjištěno, že Lst1 funguje jako cargo receptor v ER (Miller et al., 2002), který je nepostradatelný pro efektivní transport GPI – proteinů (Manzano-Lopez et al., 2015). Lst1 zastává při transportu GPI – proteinů funkci proteinu Sec24 a vytváří komplex s proteinem Sec23 (kap. 3.1)(Manzano-Lopez et al., 2015; Roberg et al., 1999). Remodelované GPI-proteiny jsou nejprve rozeznány komplexem p24, který je naváže a poté je zabudován do váčku díky vazbě k Lst1 (Manzano-Lopez et al., 2015). Zdá se, že se Lst1 obecně podílí na transportu velkých nákladů (D'Arcangelo et al., 2015). Jaký je ale přesný mechanismus, není zatím známo. Dalším příkladem jsou cargo receptory, které se stávají součástí váčku COPII pouze při transportu konkrétních proteinů, ale jindy jejich přítomnost není vyžadována (kap. 3.2).

## 4 Protein Erv14

### 4.1 Vlastnosti proteinu Erv14

Jako první charakterizovali protein Erv14 Jacqueline Powers a Charles Barlowe ve svém článku publikovaném v časopise *The Journal of Cell Biology* v roce 1998. Byl nalezen jako součást váčků COPII a identifikován v membránách ER a GA. Na základě lokalizace bylo předpovězeno, že hraje roli v exportu proteinů z ER. Gen kódující tento protein se nachází na chromozomu VII a má systematický název *YGL054c*. Erv14 je integrální membránový protein o velikosti 14 kD a je tvořený 138 aminokyselinami (Powers and Barlowe, 1998). Na základě své lokalizace v membránách ER a ve váčcích COPII (ER – vesicles) a na základě své velikosti 14 kD, byl pojmenován jako Erv14. Topologické modely předpokládají, že obsahuje tři transmembránové domény (Obr. 3) (Powers and Barlowe, 2002). Využitím „positive inside“ pravidla (von Heijne and Gavel, 1988) bylo předpovězeno, že N-konec směřuje do cytosolu a C-konec do lumen kompartmentu (Powers and Barlowe, 1998). Tento model byl později experimentálně potvrzen (Powers and Barlowe, 2002).

V *S. cerevisiae* se na chromozomu II nachází gen nazvaný *ERV15*, který dává vznik proteinu o délce 142 aminokyselin, z 63% identickému s proteinem Erv14 (Powers and Barlowe, 1998).

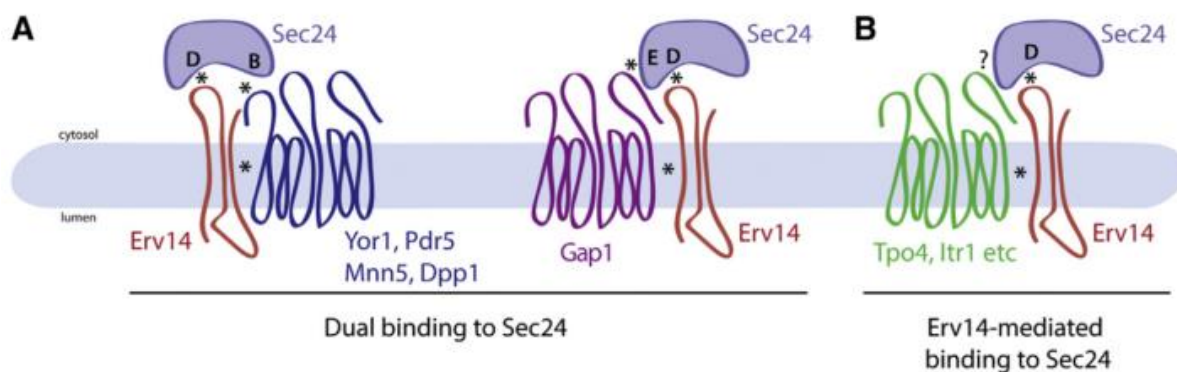


**Obr. 3: Předpokládaná struktura proteinu Erv14.** Červeně vyznačené jsou aminokyselinové zbytky plně konzervované v sekvencích Erv14 a homologních proteinů z *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *D. virilis* a *Mus musculus*. Žlutě vyznačené jsou aminokyseliny konzervované mezi 4 z 5 homologních proteinů z různých druhů eukaryot. Aminokyseliny 97 – 101 jsou místem předpokládané interakce s váčky COPII (převzato z Powers and Barlowe, 2002).

## 4.2 Funkce proteinu Erv14

### 4.2.1 Erv14 jako adaptorový protein

Protein Erv14 funguje jako adaptorový protein, který napomáhá zainkorporování nákladu do vakuoly COPII. Jeho funkce byla poprvé prokázána na transportu proteinu Axl2, který je v buňkách *erv14Δ* zadržován v ER (kap. 4.3.3) (Powers and Barlowe, 1998). Aby došlo k jeho zainkorporování do vakuoly, je nejprve nutné vytvoření komplexu Erv14 – Axl2 a následná interakce Erv14 s podjednotkami vakuoly COPII (Powers and Barlowe, 2002). Protein Erv14 má cytoplazmatickou smyčku o délce přibližně třiceti aminokyselin (Obr. 3). V této smyčce se nacházejí aminokyseliny 97 – 101 (IFRTL), které jsou klíčové pro interakci s váčky COPII (Powers and Barlowe, 2002). Pokud dojde k jejich mutaci, je schopnost Erv14 interagovat s komplexem COPII narušena. Bylo také zjištěno, že Erv14 interaguje s proteinovým komplexem Sec23/24 (Powers and Barlowe, 2002). Konkrétní aminokyseliny proteinu Sec24 zapojené v této interakci jsou S<sub>491</sub>, F<sub>576</sub> a R<sub>578</sub> a byly nazvány jako místo D (Obr. 4)(Pagant et al., 2015). Toto místo přiléhá k již identifikovanému místu B, které je důležité pro interakci Sec24 s některými přepravovanými proteiny (Mossessova et al., 2003). Při mutaci aminokyselin místa D však není zamezeno zainkorporování proteinu Erv14 stoprocentně a zdá se, že existuje další, zatím neidentifikované místo interakce se Sec24 (Pagant et al., 2015).



**Obr. 4: Interakce proteinů v rámci vakuoly COPII.** Protein Yor1 a některé další proteiny interagují přímo s místem B proteinu Sec24 a zároveň s proteinem Erv14, který se váže k místu D na proteinu Sec24. Gap1 interaguje přímo se Sec24, ale na dosud neznámém místě nazvaném E, a také s proteinem Erv14. Protein Tpo4 a některé další interagují se Sec24 na dosud neidentifikovaném místě, anebo je jejich vazba ke komplexu COPII závislá pouze na interakci s Erv14 (převzato z Pagant et al., 2015).

Veškeré proteiny, pro které slouží Erv14 jako cargo receptor, jsou transmembránové a lokalizované v pozdní části sekreční dráhy nebo v cytoplazmatické membráně (Herzig et al., 2012). Při srovnávání délek transmembránových domén proteinů z různých kompartmentů bylo zjištěno, že proteiny umístěné právě v pozdní části sekreční dráhy či v cytoplazmatické membráně mají delší transmembránové domény, protože dvojvrstva fosfolipidů je v těchto kompartmentech širší (Sharpe et al., 2010). Jelikož nebyl v proteinech vyžadujících Erv14 pro svůj transport nalezen žádný společný sekvenční motiv, který by Erv14 rozpoznával, tak se předpokládá, že Erv14 pravděpodobně rozpoznává náklad na základě délky transmembránových domén bez ovlivnění sekvencí. Je také možné, že funguje zároveň jako chaperonový protein skládající dlouhé transmembránové domény přepravovaných proteinů a usnadňuje tak jejich vstup do vaku (Herzig et al., 2012).

Bylo objeveno velké množství proteinů, jejichž průchod sekreční dráhou je závislý na proteinu Erv14 (Tab. 1). Zdaleka ne u všech je však patrné, proč ho potřebují, protože mají vlastní signál k umístění do vaku COPII. Mezi tyto proteiny patří i permeáza aminokyselin Gap1 (Malkus et al., 2002) a ABC transportér Yor1 (Pagant et al., 2007). K lepšímu porozumění tomuto problému bylo zjišťováno, jaká je interakce mezi Erv14 a nákladovým proteinem a také mezi Sec24 a nákladovým proteinem (Obr. 4)(Pagant et al., 2015). Zdá se, že pro interakci s velkým množstvím transportovaných proteinů jsou důležité aminokyseliny F<sub>62</sub>, L<sub>63</sub> a N<sub>71</sub>, které jsou součástí druhé transmembránové domény proteinu Erv14. Bylo zjištěno, že pokud buňka kóduje protein Erv14, který má tyto tři aminokyseliny mutované, pak je narušeno zainkorporování proteinu Yor1 a některých dalších proteinů do vaků COPII. Mutace těchto aminokyselin však neovlivňuje transport všech proteinů, pro které slouží Erv14 jako cargo receptor, a tak je pravděpodobné, že existuje i další, zatím neznámé, místo interakce mezi nákladem a Erv14. Místo interakce nákladu se Sec24 také nebylo jednoznačně určeno a pravděpodobně se liší pro různé skupiny proteinů (Obr. 4). Některé transportované proteiny interagují s místem B na proteinu Sec24, jako např. Yor1. Jiné mají buď odlišné místo interakce, jako např. protein Gap1, nebo jsou při transportu do vaku závislé na jiném místě na Sec24 či pouze na Erv14 a jeho interakci se Sec24. Zároveň se zdá, že v případě některých proteinů je interakce s Erv14 důležitá hlavně pro jejich efektivnější transport. Mezi tyto proteiny patří výše zmiňovaný Gap1 a Yor1 (Pagant et al., 2015).

Další pokusy ukázaly, že i protein Erv15 může mít v transportu nákladu do vaku velmi významnou funkci (Pagant et al., 2015), a to i přestože není známo, že by pouze na jeho přítomnosti závisel transport některého z proteinů z ER (Herzig et al., 2012). Protein Yor1 nebyl nalezen jako náklad pro Erv14 pomocí metody PAIRS (kap. 3.2), protože funkci Erv14 zastal v buňkách protein Erv15 a zadržování proteinu Yor1 nebylo za využití metody PAIRS viditelné (Pagant et al., 2015). U dvojitého mutantu *erv14Δerv15Δ* však bylo pozorováno výrazné zadržování proteinu Yor1 v ER. Při použití metody „in vitro budding“ bylo potvrzeno, že v buňkách *erv14Δ* je protein Yor1 transportován s menší, asi 50%, účinností, zatímco v buňkách *erv14Δerv15Δ* je transport ještě více zhoršený. Naopak buňky *erv15Δ* nevykazovaly žádný defekt v transportu Yor1 z ER. Funkce proteinu Erv15 není sama o sobě



dostatečná pro úplné vykompenzování delece *ERV14*, ale hraje v transportu významnou roli, protože *Erv15* dokáže částečně zastat funkci proteinu *Erv14* (Pagant et al., 2015).

#### 4.2.2 *Erv14* jako element ovlivňující tvorbu váčku COPII

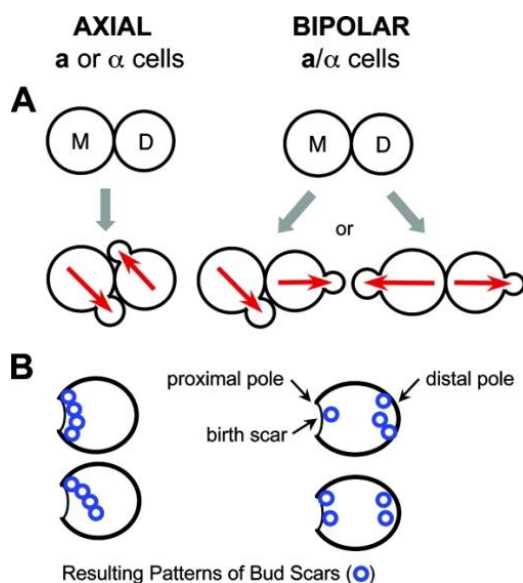
*Erv14* funguje nejen jako adaptorový protein, ale pravděpodobně je také nutný pro formování váčku COPII samotného (Powers and Barlowe, 2002). Delece některých genů, zároveň s delecí *SEC13*, vede k přežívání buněk, i když buňky *sec13Δ* nejsou životaschopné. Tento jev byl nazván jako fenotyp *bst* (kap. 3.3). Delece *ERV14* v buňkách, které neobsahují *SEC13* a zároveň *ERP1*, gen kódující protein, jenž je součástí komplexu p24 (Marzioch et al., 1999), vede k výraznému fenotypu *bst* (D'Arcangelo et al., 2015). Buňky s delecí *SEC13* a *ERP1* vykazují střední fenotyp *bst* (Copic et al., 2012) a je tak zřejmé, že nepřítomnost *Erv14* tento fenotyp zvyrazňuje (D'Arcangelo et al., 2015). Může to být dáno tím, že *Erv14* rekrutuje do váčku velké množství proteinů, které několikrát prochází membránou (Castillon et al., 2009; Herzig et al., 2012), a tak při jejich nepřítomnosti ve váčku COPII se změni i jeho struktura a zvýrazní se fenotyp *bst* (D'Arcangelo et al., 2015).

Buňky *erp1Δ*, které ve svém genomu mají jak ostatní geny kódující proteiny komplexu p24, tak i *SEC13* a *ERV14*, vykazují pouze minimální defekt v maturaci GPI – proteinů (Copic et al., 2012). Nicméně, v buňkách *erp1Δ*, které zároveň postrádají i gen *ERV14*, byl pozorován výrazný defekt v transportu GPI – proteinu plazmatické membrány, proteinu Gas1 (Conzelmann et al., 1988; Nuoffer et al., 1991), přestože protein Gas1 není nákladem pro *Erv14* (D'Arcangelo et al., 2015). To může poukazovat na aktivní vliv *Erv14* na tvorbu váčku.

### 4.3 Vliv proteinu *Erv14* na axiální pučení buněk

#### 4.3.1 Výběr místa pučení za fyziologických podmínek

U buněk kvasinky *S. cerevisiae* můžeme na základě místa vzniku nového pupene rozlišit dva typy pučení (Obr. 5) (shrnutí v Bi and Park, 2012). Prvním typem je pučení bipolární, při kterém mohou nové pupeny vznikat na obou pólech buňky, a druhým typem je pučení axiální, při kterém nový pupen vzniká na stejné straně, jako je jizva zrodu. Bipolární typ pučení je charakteristický pro *a/a* diploidy, zatímco axiální pučení je typické pro haploidní buňky *a* či *α* nebo pro buňky diploidní *a/a* nebo *α/α*. Pro určení místa pučení jsou důležité tři skupiny proteinů. První skupina je společná pro oba typy pučení, druhá se účastní pouze axiálního pučení a třetí pouze pučení bipolárního.



**Obr. 5: Výběr místa pučení v závislosti na typu buňky.** Vlevo buňka mateřská (M), vpravo buňka dceřiná (D) (převzato z Park and Bi, 2007).

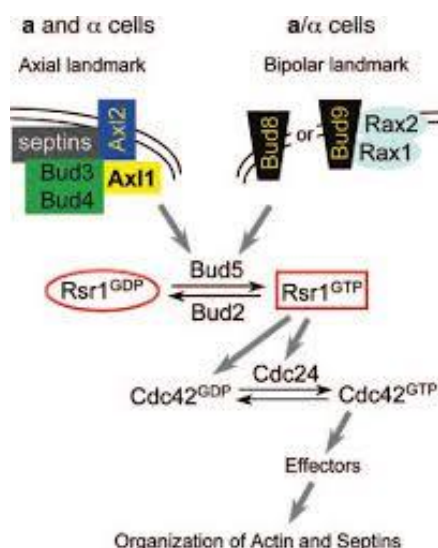
Do skupiny proteinů, která je nutná pro výběr místa vzniku pupene u obou typů pučení, patří proteiny Rsr1 (Bud1), Bud2 (Chant and Herskowitz, 1991) a Bud5 (Chant et al., 1991), souhrnně označované jako GTPázový modul Rsr1 (Obr. 3). Rsr1 je Ras-like protein, přičemž Bud2 slouží jako jeho GAP (Park et al., 1993) a Bud5 jako jeho GEF (Chant et al., 1991). Rsr1 s navázaným GTP interaguje s další molekulou Rsr1 za tvorby homodimeru (Kang et al., 2010) a také váže GTPázu Cdc42 - GDP (Kozminski et al., 2003) a její GEF, Cdc24, čímž dojde k aktivaci Cdc42 (Park et al., 1997). GTPáza Cdc42 je klíčová pro polarizaci aktinového cytoskeletu při růstu pupene (Adams et al., 1990; Johnson and Pringle, 1990; Miller and Johnson, 1994).

#### 4.3.2 Výběr místa axiálního pučení

Pokud buňka pučí axiálním způsobem, hrají důležitou roli proteiny Axl1 (Fujita et al., 1994), Axl2 (Roemer et al., 1996), Bud3 a Bud4 (Chant and Herskowitz, 1991), které fungují jako kortikální značky (Obr. 6). Protein Axl1 je jediný, jehož exprese je specifická pouze pro axiálně pučící buňky a zdá se, že je to právě on, který je klíčový k určení axiálního způsobu pučení (Fujita et al., 1994). Axl2 je transmembránový glykoprotein cytoplazmatické membrány, který hraje roli také v cytokinezi, protože v jeho nepřítomnosti jsou buňky spojené do řetízků (Halme et al., 1996; Roemer et al., 1996), a Bud3 funguje, stejně jako Cdc24, jako GEF pro GTPázu Cdc42 (Kang et al., 2014). Lokalizace Bud3, Axl1 a Axl2 je závislá na proteinu Bud4 (Kang et al., 2012). Do místa těchto kortikálních značek typických pro axiální pučení je rekrutován protein Bud5, díky kterému je na protein Rsr1 navázáno GTP. Díky lokalizaci Bud5 na základě kortikálních značek dochází k aktivaci Rsr1 pouze

v požadovaném místě, čímž je zajištěna správná orientace pučení (Kang et al., 2001; Marston et al., 2001).

Pokud je axiální pučení narušeno mutací některého z genů *BUD3*, *BUD4* (Chant and Herskowitz, 1991), *AXL1* (Fujita et al., 1994) nebo *AXL2* (Roemer et al., 1996), přechází buňka k pučení bipolárnímu.



**Obr. 6:** Aktivace polarizace aktinu a septinů při pučení (převzato z Park and Bi, 2007).

#### 4.3.3 Úloha proteinu Erv14 v axiálním typu pučení

Ukázalo se, že delece genu *ERV14* v haploidních buňkách *S. cerevisiae* má vliv na určení polarity pučení, protože buňky *erv14Δ* vykazovaly neaxiální způsob pučení (Powers and Barlowe, 1998). Aby se potvrdila odpovědnost proteinu Erv14 za tento fenotyp, byly buňky transformovány plasmidem nesoucím gen *ERV14*, díky jehož expresi pučely opět axiálním způsobem. Jelikož byl protein Erv14 nalezen v membránách ER, jako součást váčků COPII a v membránách GA, zdálo se pravděpodobné, že ovlivňuje transport některého z proteinů nutných pro určení axiálního pučení (Powers and Barlowe, 1998). Axl2 se zdál být vhodným kandidátem pro testování, protože je lokalizován v cytoplazmatické membráně, kam je transportován sekreční dráhou, kde může v rámci ER přijít do kontaktu s Erv14 (Powers and Barlowe, 1998; Roemer et al., 1996). Několika různými pokusy bylo potvrzeno, že Axl2 je v haploidních buňkách *erv14Δ* zadržován v ER (Powers and Barlowe, 1998). Pro zainkorporování Axl2 do váčků je totiž nutné vytvoření komplexu Erv14 – Axl2 a následná interakce Erv14 s podjednotkami váčku COPII. Axl2 tedy s podjednotkami váčku COPII neinteraguje přímo, ale přes adaptorový protein (Powers and Barlowe, 2002). Fenotyp haploidních buněk *erv14Δ* však není stejný jako u buněk *axl2Δ*, kde všechny buňky vykazují místo axiálního bipolární pučení

(Roemer et al., 1996). Zdá se, že Axl2 je v buňkách *erv14Δ* v omezené míře stále transportován sekreční dráhou a neaxiální způsob pučení se tak neprojevuje v takové míře (Powers and Barlowe, 1998).

Testován byl také vliv Erv15, který sdílí vysokou podobnost s proteinem Erv14 (Powers and Barlowe, 1998). Buňky *erv15Δ* nevykazovaly žádný defekt v axiálním způsobu pučení a u dvojitých mutantů *erv15Δ erv14Δ* se fenotyp nijak nelišil od buněk *erv14Δ*. *ERV15* není pravděpodobně exprimován stále, ale jen v určité části buněčného cyklu a jeho role v transportu Axl2 nebyla prokázána.

## 4.4 Vliv proteinu Erv14 na sporulaci

### 4.4.1 Podmínky sporulace a její průběh

Diploidní kvasinky, heterozygotní v *MAT* lokusu, jsou schopné při procesu sporulace vytvářet odolná stadia buněk nazývané spory. Během sporulace vznikají meiózou čtyři haploidní spory, které jsou mnohem odolnější než vegetativní buňky (shrnutí v Neiman, 2011). Kvasinky sporulují pouze za určitých podmínek, kdy dochází k omezení množství živin v prostředí. Pokud buňka nemá k dispozici dusík a jediný zdroj uhlíku je nefermentovatelný, pak podstoupí meiózu a vytvoří spory (Freese et al., 1982).

Sporulaci můžeme rozdělit na časnou, střední a pozdní fázi (shrnutí v Neiman, 2011). Buňka dokončí buněčný cyklus a zastaví se ve fázi G1. Poté pokračuje do premeiotické fáze S, kdy zreplicuje svou DNA, a následuje profáze prvního meiotického dělení a homologní rekombinace. Během střední fáze je dokončeno meiotické dělení a vytváří se prosperová membrána kolem vzniklých haploidních jader. Zároveň se do cytoplazmatického prostoru dceřiných buněk přesouvají z mateřské buňky organely. Střední fáze je ukončena přeměnou mateřské buňky v askus. Pozdní fáze začíná po úplném uzavření prosperových membrán a je charakteristická tvorbou buněčné stěny kolem spor, kondenzací chromatinu a regenerací organel.

### 4.4.2 Úloha proteinu Erv14 při tvorbě prosperové membrány

Ve střední fázi sporulace, během meiózy II, se na vnější straně dělicího vřeténka shromažďují proteiny nezbytné pro tvorbu prosperové membrány. Tyto proteiny fungují jako značka, kam mají být transportovány váčky odštěpující se od Golgiho aparátu s materiálem pro tvorbu membrány. Váčky po zakotvení fúzí a tvoří dvoustevnou membránu, která postupně obklopuje nově vznikající haploidní jádro (shrnutí v Neiman, 2011). Na tvorbě prosperové membrány se podílí i septiny, bez nichž je celý proces narušen, protože zajišťují správnou lokalizaci leading edge protein komplexu (LEP) (Heasley and McMurray, 2016). Komplex LEP se za fyziologických podmínek nachází na okrajích nově vznikající membrány a ovlivňuje její zakřivení (Moreno-Borchart et al., 2001).

Gen *SMA2* byl objeven při hledání genů účastnících se meiózy a formace prosoporové membrány. Bylo zjištěno, že protein, který kóduje, je důležitý pro správný tvar prosoporové membrány, protože v buňkách *sma2Δ* je protein Don1, který je součástí komplexu LEP, špatně lokalizován (Rabitsch et al., 2001). Na základě sekvence bylo předpovězeno, že Sma2 obsahuje čtyři transmembránové domény, a mohl by tak být nákladem pro protein Erv14 (Nakanishi et al., 2007).

To, že protein Erv14 hraje roli ve sporulaci, bylo zjištěno již při jeho popsání (Powers and Barlowe, 1998), ale přesný způsob ovlivnění sporulace byl objasněn až o několik let později (Nakanishi et al., 2007). Bylo zjištěno, že diploidní buňky *erv14Δerv14Δ* nejsou schopny normálně sporulovat za standardních podmínek, i když životaschopnost buněk není změněna (Powers and Barlowe, 1998). Významné procento těchto buněk má srpovitý tvar prosoporové membrány, přičemž velmi podobný fenotyp byl pozorován i u buněk *sma2Δ* (Nakanishi et al., 2007). Pokud je v buňkách postrádajících gen kódující protein Erv14 nadprodukován protein Sma2, dojde ke zlepšení sporulace. Naopak, při nadprodukci proteinu Erv14 v buňkách *sma2Δ* není žádné zlepšení znatelné. Dá se tedy předpokládat, že Erv14 ovlivňuje sporulaci díky svému vlivu na transport proteinu Sma2. Zlepšení sporulace při nadprodukci Sma2 však není tak výrazné, což naznačuje, že během sporulace Erv14 ovlivňuje transport i dalších proteinů.

Byl testován i vliv proteinu Erv15 na sporulační defekt pozorovaný u buněk *erv14Δ* (Nakanishi et al., 2007). Jeho nadprodukce vedla k viditelnému zlepšení sporulace a naopak v buňkách *erv14Δerv15Δ* se sporulační defekt ještě zvýraznil. Buňky, které mají funkční gen *ERV14*, ale postrádají *ERV15*, žádný defekt nevykazují. Erv15 tedy dokáže při sporulaci zastat funkci Erv14 (Tab.2).

Bylo zjišťováno, zda Erv14 ovlivňuje transport i dalších proteinů prosoporové či plazmatické membrány (Nakanishi et al., 2007). Sledována byla lokalizace t – SNARE proteinu Sso1 (Aalto et al., 1993) důležitého pro splývání váčků nesoucích materiál pro vznikající prosoporovou membránu a tedy potřebného pro její formaci (Nakanishi et al., 2006), H<sup>+</sup> - ATPázy plazmatické membrány Pma1 (Serrano et al., 1986) a dityrosinového transportéru Dtr1, který je důležitý během sporulace pro transport bisformyl dityrosinu skrz prosoporovou membránu do nově vznikající buněčné stěny spory (Felder et al., 2002), v buňkách divokého typu, *erv14Δ*, *erv15Δ* a *erv14Δerv15Δ* a to jak v buňkách sporulujících, tak i vegetativních (Nakanishi et al., 2007). Ukázalo se, že požadavek na Erv14 pro transport těchto proteinů může být ve vegetativních a sporulujících buňkách odlišný.

Lokalizace t – SNARE proteinu Sso1 v buňkách divokého typu, *erv14Δ*, *erv15Δ* a *erv14Δerv15Δ* je shrnuta v tabulce č. 2. Ve vegetativních buňkách delece genu *ERV14* ani *ERV15* lokalizaci proteinu Sso1 v plazmatické membráně neovlivňuje. Ve sporulujících buňkách, nesoucích *ERV14* i *ERV15*, je Sso1 lokalizován pouze v prosoporové membráně. V dvojítech mutantech *erv14Δerv15Δ* je protein Sso1 kompletně zadržován v endoplazmatickém retikulu (Nakanishi et al., 2007). V buňkách postrádajících pouze protein Erv14 je protein Sso1 zadržován v ER pouze částečně,

byl ale detekován i v prosoprové membráně. Funkci proteinu Erv14 tak v těchto buňkách pravděpodobně zastane protein Erv15.

kmen	Divoký typ		<i>erv14Δ</i>		<i>erv15Δ</i>		<i>erv14Δerv15Δ</i>	
buňky	vegetativní	sporulující	vegetativní	sporulující	vegetativní	sporulující	vegetativní	sporulující
lokalizace	PM	PSM	PM	PSM/ER	PM	PSM	PM	ER

**Tab. 2: Lokalizace t-SNARE proteinu Sso1 v buňkách obsahujících geny *ERV14* i *ERV15* (divoký typ), v buňkách s delecí *ERV14* či *ERV15* a také v buňkách s delecí obou těchto genů.** Protein v závislosti na typu buňky je lokalizován buď v plazmatické membráně (PM), prosoprové membráně (PSM) či v endoplazmatickém retikulu (ER) (informace převzaty z Nakanishi et al., 2007).

Lokalizace  $H^+$  - ATPázy plazmatické membrány Pma1 a dityrosinového transportéru Dtr1v buňkách divokého typu, *erv15Δ* a *erv14Δerv15Δ* byla podobná lokalizaci proteinu Sso1, ale v buňkách *erv14Δ* byly oba studované proteiny více zadržovány v ER a méně se dostávaly do prosoprové membrány, než protein Sso1 (Nakanishi et al., 2007).

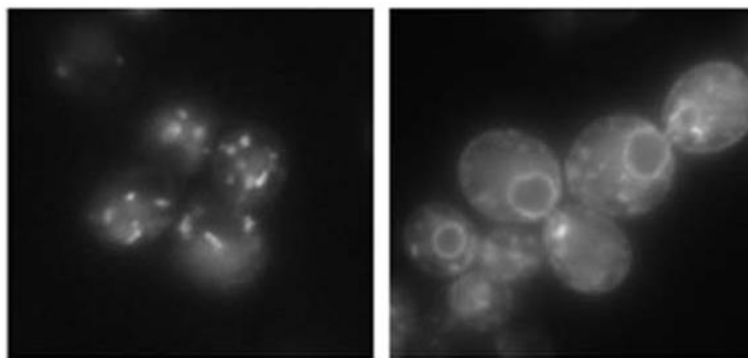
#### 4.5 Vliv proteinu Erv14 na tvorbu chitinu

Tvorba chitinu je v *S. cerevisiae* zajišťována třemi enzymy, chitin syntázou I (CSI) (Kang et al., 1984), chitin syntázou II (CSII) (Sburlati and Cabib, 1986) a chitin syntázou III (CSIII) (Bulawa and Osmond, 1990). CSI má za úkol opravy buněčné stěny (Cabib et al., 1989), CSII je důležitá pro tvorbu primárního septa (Silverman et al., 1988) a CSIII zastává tvorbu chitinu za všech ostatních situací (Shaw et al., 1991). Většina chitinu tvořeného CSIII vytváří během pučení chitinový prstenec a po oddělení pupene zůstává jako součást jizvy na mateřské buňce a malá část je součástí buněčné stěny (Shaw et al., 1991).

Protein Chs3 je katalytickou podjednotkou CSIII (Valdivieso et al., 1991). Podle topologických modelů obsahuje Chs3 čtyři globulární domény, ale přesný počet transmembránových segmentů není znám (Banks et al., 2005; Merzendorfer, 2011). N-terminální doména (I) proteinu Chs3 je důležitá pro správný průběh transportu z ER do plazmatické membrány, protože se účastní tvorby oligomerů, pravděpodobně dimerů, s dalším proteinem Chs3 (Sacristan et al., 2013). Pokud je protein Chs3 zkrácen na N – konci, je sice transportován z ER, ale v GA je rozeznán jako špatně složený a je ve váčcích COPI transportován zpět do ER (Sacristan et al., 2013). Chs7 je chaperonový protein ER, který zajišťuje správnou konformaci Chs3 a je pro transport nepostradatelný (Trilla et al., 1999). Není však jediný. Aby došlo k zainkorporování do váčku, vyžaduje protein Chs3 cargo receptor Erv14 a tato interakce je nezávislá na přítomnosti proteinu Chs7 (Sacristan et al., 2013). V nepřítomnosti Erv14 je protein Chs3

zadržován v ER (Obr. 7), což ve výsledku vede ke snížené tvorbě chitinu. To bylo potvrzeno i vysokou odolností buněk *erv14Δ* vůči kalkofluoru, který se váže na struktury obsahující chitin. I když je protein Chs3 zkrácený na N – konci, stále interaguje s Erv14 efektivně (Sacristan et al., 2013).

Interakce Erv14 – Chs3 se tedy děje pravděpodobně přes transmembránovou doménu, jak bylo obecně předpovězeno pro interakci Erv14 s nákladem (Herzig et al., 2012).



**Obr. 7: Lokalizace proteinu Chs3, značeného pomocí GFP, v buňkách divokého typu a v buňkách *erv14Δ*.** Na obrázku vlevo je vidět lokalizace proteinu Chs3, značeného pomocí GFP, v buňkách nesoucích protein Erv14. Na obrázku vpravo jsou buňky *erv14Δ*, u kterých je patrné zadržování proteinu Chs3, značeného pomocí GFP, v ER (převzato z Sacristan et al., 2013).

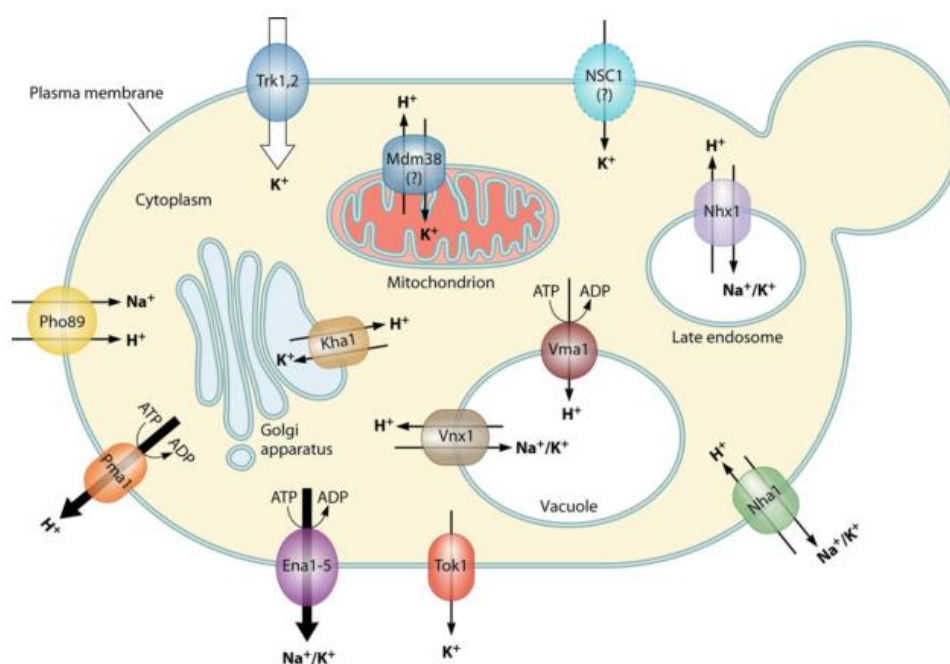
## 4.6 Vliv proteinu Erv14 na citlivost k solím

### 4.6.1 Udržování homeostáze kationtů alkalických kovů v buňkách

Aby mohly buňky *S. cerevisiae* správně fungovat, musí si udržovat stálou hladinu kationtů alkalických kovů (shrnutí v Arino et al., 2010). Musí aktivně akumulovat draselné kationty, které jsou hlavními vnitrobuněčnými kationty. Jsou nezbytné pro udržování membránového potenciálu, regulaci buněčného objemu a pH, aktivaci enzymů, syntézu proteinů a kompenzaci negativního náboje některých makromolekul. Naopak se buňky musí aktivně zbavovat sodných kationtů, které jsou pro ně toxické. Sodné kationty způsobují osmotický stres a inhibují enzymatickou aktivitu. K udržování stálé hladiny kationtů alkalických kovů v cytoplazmě využívají buňky pasivní transport, primární aktivní transport a sekundární aktivní transport. Transportéry kationtů alkalických kovů se nacházejí jak v plazmatické membráně, tak v membránách některých organel (Obr. 8). V plazmatické membráně je lokalizováno šest hlavních, dobře charakterizovaných, transportních systémů pro kationty alkalických kovů (Obr. 8) (shrnutí v Arino et al., 2010). Patří mezi ně napětově řízený draslíkový kanál Tok1, který umožňuje transport draselných kationtů ven z buňky (Bertl et al., 1993; Ketchum et al., 1995), vysokoafinitní transportéry Trk1 a Trk2 zajišťující příjem  $K^+$  do buňky (Gaber et al., 1988; Ko et al., 1990),  $P_i - Na^+$  symportér Pho89 zprostředkující příjem fosfátových aniontů z prostředí o zásaditém pH (Persson et al.,

1998), ATPázy Ena využívající k exportu sodných a draselných kationtů energii získanou štěpením ATP (Benito et al., 2002; Haro et al., 1991) a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+/\text{H}^+$  antiporter Nha1. Nha1 zprostředkovává export sodných a draselných kationtů z buněk v prostředích s kyselým pH za využití energie elektrochemického gradientu protonů, který je vytvářen  $\text{H}^+$  ATPázou Pma1 lokalizovanou v plazmatické membráně (Banuelos et al., 1998; Prior et al., 1996). K významným transportérům kationtů alkalických kovů v membránách organel patří antiportery transportující kationty alkalických kovů výměnou za  $\text{H}^+$ , Vnx1 (Cagnac et al., 2007) nacházející se ve vakuolární membráně, endozomální Nhx1 (Nass et al., 1997; Nass and Rao, 1998) a Kha1 (Ramirez et al., 1998) v membránách GA (Maresova and Sychrova, 2005)(Obr. 8) (shrnutí v Arino et al., 2010).

Byla dokázána existence i dalších transportních systémů pro kationty alkalických kovů, jako je Nsc1 v plazmatické membráně nebo transportér v membráně mitochondrií, ale geny, které je kódují, dosud nebyly identifikovány (shrnutí v Arino et al., 2010).



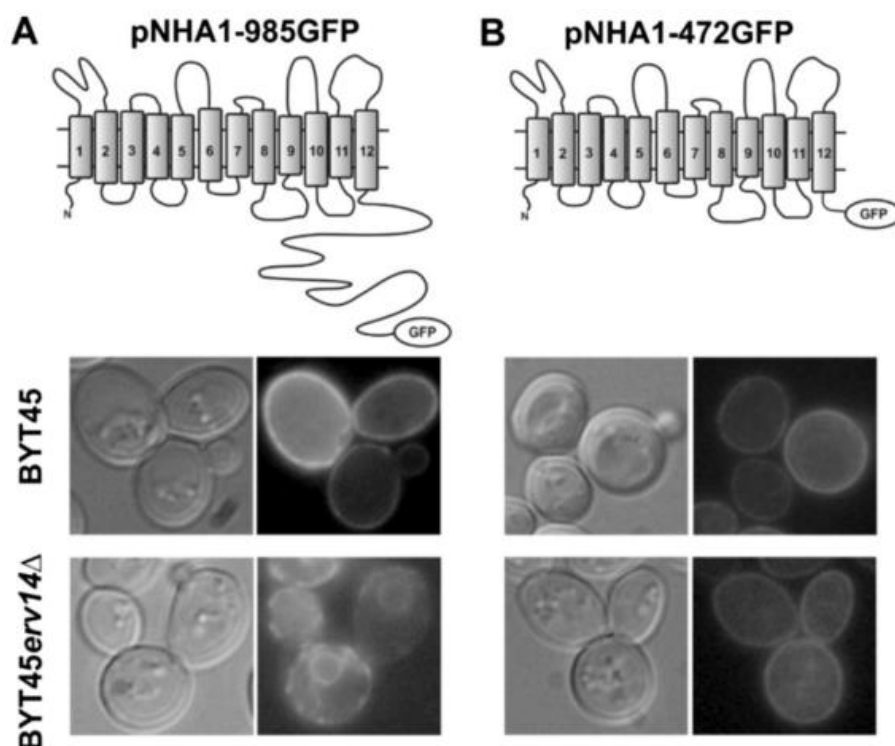
**Obr. 8: Transportéry kationtů alkalických kovů v *S. cerevisiae* (převzato z Arino et al., 2010).**



#### 4.6.2 Vliv proteinu Erv14 na transportér Nha1

Pomocí metody PAIRS (kap. 3.2) byla objevena interakce Erv14 s proteinem Nha1 (Herzig et al., 2012), který má 12 transmembránových domén (Kinclova et al., 2001), čímž odpovídá modelu proteinu rozpoznávaného pomocí cargo receptoru Erv14 (kap. 4.2.1) (Herzig et al., 2012). Nejprve bylo zjišťováno, jaký má Erv14 vliv na toleranci buněk k NaCl a KCl (Rosas-Santiago et al., 2016). Buňky divokého kmene *S. cerevisiae*, které nesly gen kódující antiporter Nha1, ale neměly gen kódující protein Erv14, hůř rostly v přítomnosti NaCl a částečné narušení růstu bylo pozorováno i v přítomnosti KCl. Další pokusy interakci mezi proteiny Erv14 a Nha1 potvrdily a zároveň ukázaly, že se děje přes transmembránové domény transportéru (Rosas-Santiago et al., 2016).

Jelikož má protein Nha1 dlouhý hydrofilní C - konec, tvořící 56,2% celého proteinu (Obr. 9) (Kinclova et al., 2001), který je důležitý pro jeho transportní aktivitu a pro rychlou reakci buňky na hyperosmotický šok (Kinclova-Zimmermannova and Sychrova, 2006; Kinclova et al., 2001), byl testován i vliv přítomnosti C – konce Nha1 na lokalizaci antiporteru v buňkách (Obr. 9) (Rosas-Santiago et al., 2016). Sledovala se lokalizace nezkráceného proteinu Nha1 o celkové délce 985 aminokyselin a lokalizace mutované verze proteinu Nha1, postrádající C – koncovou část, o délce 472 aminokyselin, a to jak v buňkách nesoucích *ERV14*, tak v buňkách *erv14Δ*. Plná i zkrácená verze Nha1 byly značené pomocí GFP a jejich lokalizace byla určována na základě fluorescence. V buňkách nesoucích *ERV14*, byl nezkrácený protein Nha1, i mutovaný protein o délce 472 aminokyselin, lokalizován v plazmatické membráně. V buňkách *erv14Δ* byl protein Nha1 zadržován pravděpodobně v perinukleárním ER a fluorescence byla viditelná i v periférii buněk. To může znamenat, že se protein Nha1 částečně dostává do plazmatické membrány i v nepřítomnosti Erv14 anebo že je zadržován v periplazmatickém ER. Zkrácená verze proteinu Nha1 postrádající hydrofilní C – koncovou část byla v buňkách *erv14Δ* detekována pouze na úrovni plazmatické membrány či periplazmatického ER. Z těchto výsledků vyplývá, že protein Erv14 ovlivňuje transport proteinu Nha1 do plazmatické membrány a i přes to, že Erv14 interaguje s transmembránovými doménami antiporteru Nha1, je lokalizace Nha1 ovlivněna přítomností C – koncové části proteinu (Rosas-Santiago et al., 2016).



**Obr. 9: Lokalizace proteinu Nha1 značeného GFP v buňkách BYT45 a BYT45*erv14*Δ.** Buňky kmene BYT45 postrádají geny kódující protein Nha1 (*nha1*Δ) a ATPázy Ena (*ena1-5*Δ) (Navarrete et al., 2010). Buňky byly transformovány plasmidem nesoucím gen kódující plnou (A) či zkrácenou verzi proteinu Nha1 (B), značenou pomocí GFP. Na obrázku vlevo je vidět topologický model nezkrácené verze proteinu Nha1, značeného pomocí GFP, o celkové délce 985 aminokyselin. Pod ním je ukázána jeho lokalizace v buňkách kmene BYT45 a BYT45*erv14*Δ. Obrázek vpravo zobrazuje topologický model zkrácené verze proteinu Nha1, značené pomocí GFP, postrádající C – koncovou část, o délce 472 aminokyselin. Pod ním je opět vidět jeho lokalizace v buňkách BYT45 a BYT45 *erv14*Δ (převzato z Rosas-Santiago et al., 2016).

Zjišťována byla i schopnost zkráceného i nezkráceného proteinu Nha1 v buňkách kódujících protein Erv14 i v buňkách *erv14*Δ transportovat sodné kationty ven z buňky (Rosas-Santiago et al., 2016). Buňky produkující zkrácený protein Nha1 o délce 472 aminokyselin vykazovaly stejně efektivní export iontů Na<sup>+</sup> v přítomnosti proteinu Erv14 i v jeho nepřítomnosti. Viditelný rozdíl byl však u buněk kódujících nezkrácený protein Nha1, kdy buňky v přítomnosti Erv14 vykazovaly vyšší export Na<sup>+</sup> kationtů než buňky postrádající Erv14, což ukazuje na zadržování nezkrácené verze proteinu Nha1 v ER v nepřítomnosti Erv14 (Rosas-Santiago et al., 2016).

V plazmatické membráně se protein Nha1 vyskytuje jako dimer, což je důležité pro jeho transportní funkci (Mitsui et al., 2005). Při western blotové analýze bylo zjištěno, že buňky nesoucí gen

*ERV14* vykazovaly častější výskyt Nha1 ve formě dimeru, než buňky *erv14Δ*, což ukazuje, že Erv14 je pravděpodobně také potřebný pro dimerizaci antiporteru Nha1 (Rosas-Santiago et al., 2016).

Vliv proteinu Erv14 na transportér Nha1 byl prokázán, nicméně buňky postrádající exportéry kationtů alkalických kovů (*ena1-5Δnha1Δ*) rostou lépe v médiu obsahujícím NaCl a KCl než buňky postrádající navíc i protein Erv14 (*ena1-5Δnha1Δerv14Δ*), což naznačuje, že protein Erv14 ovlivňuje i jiný transportní systém pro kationty alkalických kovů významný pro toleranci buněk k přítomnosti NaCl a KCl (Rosas-Santiago et al., 2016).

#### **4.7 Homology proteinu Erv14 u ostatních eukaryot**

Homologní proteiny Erv14 se nachází mezi různými druhy eukaryot (Rosas-Santiago et al., 2015; Roth et al., 1995; Schwenk et al., 2009). U *Drosophila melanogaster* byl nalezen gen *cornichon*, kódující protein Cni (Roth et al., 1995). Stejně jako Erv14, který slouží jako cargo receptor pro Axl2, čímž se podílí na určení polarity pučení (kap. 4.3.3) (Powers and Barlowe, 1998, 2002), tak i Cni funguje jako cargo receptor pro protein důležitý pro určení polarity během oogeneze (Bokel et al., 2006). U člověka byly nalezeny čtyři homology Erv14 a Cni, nazvané CNIH, CNIH2, CNIH3 a CNIH4 (cornichon homolog) (Castro et al., 2007; Utku et al., 1999). Na základě porovnání aminokyselinových sekvencí Erv14, Cni a CNIH bylo předpokládáno, že jak Cni, tak CNIH, stejně jako Erv14, třikrát prochází membránou (Castro et al., 2007; Powers and Barlowe, 2002). Všechny se také pohybují z ER do GA a zpět a pravděpodobně plní i podobné funkce (Castro et al., 2007). Na rozdíl od CNIH, jsou ostatní lidské homologní proteiny s Erv14 a Cni, CNIH2 a CNIH3, asociované s funkcí glutamátových receptorů centrálního nervového systému a funkci cargo receptorů pravděpodobně neplní (Schwenk et al., 2009). Proteiny homologní s Erv14 se nenacházejí pouze v říši živočichů a hub, ale také v říši rostlin (Rosas-Santiago et al., 2015). Z genomu rýže byl vyizolován gen kódující homolog nazvaný *OsCNIH1* (Rosas-Santiago et al., 2015). Ten slouží jako cargo receptor pro Na<sup>+</sup> transportér *OsHKT1;3* lokalizovaný v membránách GA.

## 5 Závěr

Tvorba proteinů a jejich transport do místa působení je jedním ze základních předpokladů pro správné fungování eukaryotické buňky. Pro všechny proteiny procházející sekreční dráhou platí, že jsou nejprve transportovány do ER, odkud pokračují dále prostřednictvím váčků COPII do GA. Některé transportované proteiny nemají sekvence přímo rozpoznávané podjednotkami váčku COPII a k této interakci vyžadují cargo receptor, který dokáže interagovat jak s transportovaným proteinem, tak s podjednotkou váčku COPII. V této bakalářské práci jsem shrnula vše, co bylo dosud publikováno o kvasinkovém cargo receptoru Erv14 nacházejícím se v membránách ER, váčcích COPII a GA. Na základě shrnutých poznatků se dá vyvozovat, že protein Erv14 hraje v *S. cerevisiae* velmi důležitou roli, protože při jeho absenci je narušen transport proteinů důležitých pro axiální pučení (Axl2), sporulaci (Sma2), tvorbu chitinu (Chs3) a odolnost vůči NaCl a KCl (Nha1). Nha1 však zřejmě není jediným transportérem, který umožňuje buňce tolerovat vyšší koncentrace NaCl a KCl a zároveň je ovlivněn proteinem Erv14. Objevení dalšího transportéru, který interaguje s Erv14 a zároveň zvyšuje toleranci buněk vůči NaCl a KCl, by mohlo být jedním z cílů při výzkumu transportních systémů pro kationty alkalických kovů v buňkách *S. cerevisiae*. Zároveň podrobnější analýza interakcí Erv14 s proteiny, nalezenými pomocí metody PAIRS jako náklad tohoto proteinu, by mohla přinést nové poznatky o roli Erv14.

## Seznam použité literatury

- Aalto, M.K., Ronne, H., and Keranen, S. (1993). Yeast syntaxins Sso1p and Sso2p belong to a family of related membrane proteins that function in vesicular transport. *EMBO J* 12, 4095-4104.
- Adams, A.E., Johnson, D.I., Longnecker, R.M., Sloat, B.F., and Pringle, J.R. (1990). *CDC42* and *CDC43*, two additional genes involved in budding and the establishment of cell polarity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 111, 131-142.
- Antonny, B., Madden, D., Hamamoto, S., Orci, L., and Schekman, R. (2001). Dynamics of the COPII coat with GTP and stable analogues. *Nat Cell Biol* 3, 531-537.
- Arino, J., Ramos, J., and Sychrova, H. (2010). Alkali metal cation transport and homeostasis in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* 74, 95-120.
- Banks, I.R., Specht, C.A., Donlin, M.J., Gerik, K.J., Levitz, S.M., and Lodge, J.K. (2005). A chitin synthase and its regulator protein are critical for chitosan production and growth of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* 4, 1902-1912.
- Banuelos, M.A., Sychrova, H., Bleykasten-Grosshans, C., Souciet, J.L., and Potier, S. (1998). The Nha1 antiporter of *Saccharomyces cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux. *Microbiology* 144 ( Pt 10), 2749-2758.
- Barlowe, C., Orci, L., Yeung, T., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Salama, N., Rexach, M.F., Ravazzola, M., Amherdt, M., and Schekman, R. (1994). COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell* 77, 895-907.
- Barlowe, C., and Schekman, R. (1993). *SEC12* encodes a guanine-nucleotide-exchange factor essential for transport vesicle budding from the ER. *Nature* 365, 347-349.
- Barlowe, C.K., and Miller, E.A. (2013). Secretory protein biogenesis and traffic in the early secretory pathway. *Genetics* 193, 383-410.
- Belden, W.J., and Barlowe, C. (2001). Role of Erv29p in collecting soluble secretory proteins into ER-derived transport vesicles. *Science* 294, 1528-1531.
- Benito, B., Garciadeblas, B., and Rodriguez-Navarro, A. (2002). Potassium- or sodium-efflux ATPase, a key enzyme in the evolution of fungi. *Microbiology* 148, 933-941.
- Bertl, A., Slayman, C.L., and Gradmann, D. (1993). Gating and conductance in an outward-rectifying K<sup>+</sup> channel from the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Membr Biol* 132, 183-199.
- Bhattacharya, N., J, O.D., and Stagg, S.M. (2012). The structure of the Sec13/31 COPII cage bound to Sec23. *J Mol Biol* 420, 324-334.
- Bi, E., and Park, H.O. (2012). Cell polarization and cytokinesis in budding yeast. *Genetics* 191, 347-387.
- Bi, X., Corpina, R.A., and Goldberg, J. (2002). Structure of the Sec23/24-Sar1 pre-budding complex of the COPII vesicle coat. *Nature* 419, 271-277.
- Bi, X., Mancias, J.D., and Goldberg, J. (2007). Insights into COPII coat nucleation from the structure of Sec23.Sar1 complexed with the active fragment of Sec31. *Dev Cell* 13, 635-645.

- Bielli, A., Haney, C.J., Gabreski, G., Watkins, S.C., Bannykh, S.I., and Aridor, M. (2005). Regulation of Sar1 NH<sub>2</sub> terminus by GTP binding and hydrolysis promotes membrane deformation to control COPII vesicle fission. *J Cell Biol* 171, 919-924.
- Bokel, C., Dass, S., Wilsch-Brauninger, M., and Roth, S. (2006). *Drosophila* Cornichon acts as cargo receptor for ER export of the TGF $\alpha$ -like growth factor gurken. *Development* 133, 459-470.
- Bue, C.A., Bentivoglio, C.M., and Barlowe, C. (2006). Erv26p directs pro-alkaline phosphatase into endoplasmic reticulum-derived coat protein complex II transport vesicles. *Mol Biol Cell* 17, 4780-4789.
- Bulawa, C.E., and Osmond, B.C. (1990). Chitin synthase I and chitin synthase II are not required for chitin synthesis in vivo in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 7424-7428.
- Cabib, E., Sburlati, A., Bowers, B., and Silverman, S.J. (1989). Chitin synthase 1, an auxiliary enzyme for chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 108, 1665-1672.
- Cagnac, O., Leterrier, M., Yeager, M., and Blumwald, E. (2007). Identification and characterization of Vnx1p, a novel type of vacuolar monovalent cation/H<sup>+</sup> antiporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 282, 24284-24293.
- Caldwell, S.R., Hill, K.J., and Cooper, A.A. (2001). Degradation of endoplasmic reticulum (ER) quality control substrates requires transport between the ER and Golgi. *J Biol Chem* 276, 23296-23303.
- Castillon, G.A., Watanabe, R., Taylor, M., Schwabe, T.M., and Riezman, H. (2009). Concentration of GPI-anchored proteins upon ER exit in yeast. *Traffic* 10, 186-200.
- Castro, C.P., Piscopo, D., Nakagawa, T., and Derynck, R. (2007). Cornichon regulates transport and secretion of TGF $\alpha$ -related proteins in metazoan cells. *J Cell Sci* 120, 2454-2466.
- Conzelmann, A., Riezman, H., Desponds, C., and Bron, C. (1988). A major 125-kd membrane glycoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is attached to the lipid bilayer through an inositol-containing phospholipid. *EMBO J* 7, 2233-2240.
- Copic, A., Latham, C.F., Horlbeck, M.A., D'Arcangelo, J.G., and Miller, E.A. (2012). ER cargo properties specify a requirement for COPII coat rigidity mediated by Sec13p. *Science* 335, 1359-1362.
- D'Arcangelo, J.G., Crissman, J., Pagant, S., Copic, A., Latham, C.F., Snapp, E.L., and Miller, E.A. (2015). Traffic of p24 proteins and COPII coat composition mutually influence membrane scaffolding. *Curr Biol* 25, 1296-1305.
- D'Arcangelo, J.G., Stahmer, K.R., and Miller, E.A. (2013). Vesicle-mediated export from the ER: COPII coat function and regulation. *Biochim Biophys Acta* 1833, 2464-2472.
- Elrod-Erickson, M.J., and Kaiser, C.A. (1996). Genes that control the fidelity of endoplasmic reticulum to Golgi transport identified as suppressors of vesicle budding mutations. *Mol Biol Cell* 7, 1043-1058.
- Felder, T., Bogengruber, E., Tenreiro, S., Ellinger, A., Sa-Correia, I., and Briza, P. (2002). Dtr1p, a multidrug resistance transporter of the major facilitator superfamily, plays an essential role in spore wall maturation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 1, 799-810.
- Feyder, S., De Craene, J.O., Bar, S., Bertazzi, D.L., and Friant, S. (2015). Membrane trafficking in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* model. *Int J Mol Sci* 16, 1509-1525.
- Freese, E.B., Chu, M.I., and Freese, E. (1982). Initiation of yeast sporulation of partial carbon, nitrogen, or phosphate deprivation. *J Bacteriol* 149, 840-851.

- Fujita, A., Oka, C., Arikawa, Y., Katagai, T., Tonouchi, A., Kuhara, S., and Misumi, Y. (1994). A yeast gene necessary for bud-site selection encodes a protein similar to insulin-degrading enzymes. *Nature* 372, 567-570.
- Gaber, R.F., Styles, C.A., and Fink, G.R. (1988). *TRK1* encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 8, 2848-2859.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., et al. (1996). Life with 6000 genes. *Science* 274, 546, 563-547.
- Halme, A., Michelitch, M., Mitchell, E.L., and Chant, J. (1996). Bud10p directs axial cell polarization in budding yeast and resembles a transmembrane receptor. *Curr Biol* 6, 570-579.
- Haro, R., Garciadeblas, B., and Rodriguez-Navarro, A. (1991). A novel P-type ATPase from yeast involved in sodium transport. *FEBS Lett* 291, 189-191.
- Heasley, L.R., and McMurray, M.A. (2016). Roles of septins in prospore membrane morphogenesis and spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 27, 442-450.
- Herzig, Y., Sharpe, H.J., Elbaz, Y., Munro, S., and Schuldiner, M. (2012). A systematic approach to pair secretory cargo receptors with their cargo suggests a mechanism for cargo selection by Erv14. *PLoS Biol* 10, e1001329.
- Hou, J., Tyo, K.E., Liu, Z., Petranovic, D., and Nielsen, J. (2012). Metabolic engineering of recombinant protein secretion by *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 12, 491-510.
- Chant, J., Corrado, K., Pringle, J.R., and Herskowitz, I. (1991). Yeast *BUD5*, encoding a putative GDP-GTP exchange factor, is necessary for bud site selection and interacts with bud formation gene *BEM1*. *Cell* 65, 1213-1224.
- Chant, J., and Herskowitz, I. (1991). Genetic control of bud site selection in yeast by a set of gene products that constitute a morphogenetic pathway. *Cell* 65, 1203-1212.
- Inadome, H., Noda, Y., Adachi, H., and Yoda, K. (2005). Immunolocalization of the yeast Golgi subcompartments and characterization of a novel membrane protein, Svp26, discovered in the Sed5-containing compartments. *Mol Cell Biol* 25, 7696-7710.
- Johnson, D.I., and Pringle, J.R. (1990). Molecular characterization of *CDC42*, a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in the development of cell polarity. *J Cell Biol* 111, 143-152.
- Kaiser, C.A., and Schekman, R. (1990). Distinct sets of *SEC* genes govern transport vesicle formation and fusion early in the secretory pathway. *Cell* 61, 723-733.
- Kang, M.S., Elango, N., Mattia, E., Au-Young, J., Robbins, P.W., and Cabib, E. (1984). Isolation of chitin synthetase from *Saccharomyces cerevisiae*. Purification of an enzyme by entrapment in the reaction product. *J Biol Chem* 259, 14966-14972.
- Kang, P.J., Angerman, E., Jung, C.H., and Park, H.O. (2012). Bud4 mediates the cell-type-specific assembly of the axial landmark in budding yeast. *J Cell Sci* 125, 3840-3849.
- Kang, P.J., Beven, L., Hariharan, S., and Park, H.O. (2010). The Rsr1/Bud1 GTPase interacts with itself and the Cdc42 GTPase during bud-site selection and polarity establishment in budding yeast. *Mol Biol Cell* 21, 3007-3016.
- Kang, P.J., Lee, M.E., and Park, H.O. (2014). Bud3 activates Cdc42 to establish a proper growth site in budding yeast. *J Cell Biol* 206, 19-28.

- Kang, P.J., Sanson, A., Lee, B., and Park, H.O. (2001). A GDP/GTP exchange factor involved in linking a spatial landmark to cell polarity. *Science* 292, 1376-1378.
- Ketchum, K.A., Joiner, W.J., Sellers, A.J., Kaczmarek, L.K., and Goldstein, S.A. (1995). A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature* 376, 690-695.
- Kinclova-Zimmermannova, O., and Sychrova, H. (2006). Functional study of the Nha1p C-terminus: involvement in cell response to changes in external osmolarity. *Curr Genet* 49, 229-236.
- Kinclova, O., Ramos, J., Potier, S., and Sychrova, H. (2001). Functional study of the *Saccharomyces cerevisiae* Nha1p C-terminus. *Mol Microbiol* 40, 656-668.
- Ko, C.H., Buckley, A.M., and Gaber, R.F. (1990). *TRK2* is required for low affinity K<sup>+</sup> transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 125, 305-312.
- Kota, J., Gilstring, C.F., and Ljungdahl, P.O. (2007). Membrane chaperone Shr3 assists in folding amino acid permeases preventing precocious ERAD. *J Cell Biol* 176, 617-628.
- Kozminski, K.G., Beven, L., Angerman, E., Tong, A.H., Boone, C., and Park, H.O. (2003). Interaction between a Ras and a Rho GTPase couples selection of a growth site to the development of cell polarity in yeast. *Mol Biol Cell* 14, 4958-4970.
- Kuehn, M.J., Schekman, R., and Ljungdahl, P.O. (1996). Amino acid permeases require COPII components and the ER resident membrane protein Shr3p for packaging into transport vesicles in vitro. *J Cell Biol* 135, 585-595.
- Kung, L.F., Pagant, S., Futai, E., D'Arcangelo, J.G., Buchanan, R., Dittmar, J.C., Reid, R.J., Rothstein, R., Hamamoto, S., Snapp, E.L., et al. (2012). Sec24p and Sec16p cooperate to regulate the GTP cycle of the COPII coat. *EMBO J* 31, 1014-1027.
- Lau, W.T., Howson, R.W., Malkus, P., Schekman, R., and O'Shea, E.K. (2000). Pho86p, an endoplasmic reticulum (ER) resident protein in *Saccharomyces cerevisiae*, is required for ER exit of the high-affinity phosphate transporter Pho84p. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 1107-1112.
- Lee, M.C., Orci, L., Hamamoto, S., Futai, E., Ravazzola, M., and Schekman, R. (2005). Sar1p N-terminal helix initiates membrane curvature and completes the fission of a COPII vesicle. *Cell* 122, 605-617.
- Ljungdahl, P.O., Gimeno, C.J., Styles, C.A., and Fink, G.R. (1992). *SHR3*: a novel component of the secretory pathway specifically required for localization of amino acid permeases in yeast. *Cell* 71, 463-478.
- Malkus, P., Jiang, F., and Schekman, R. (2002). Concentrative sorting of secretory cargo proteins into COPII-coated vesicles. *J Cell Biol* 159, 915-921.
- Manzano-Lopez, J., Perez-Linero, A.M., Aguilera-Romero, A., Martin, M.E., Okano, T., Silva, D.V., Seeberger, P.H., Riezman, H., Funato, K., Goder, V., et al. (2015). COPII coat composition is actively regulated by luminal cargo maturation. *Curr Biol* 25, 152-162.
- Maresova, L., and Sychrova, H. (2005). Physiological characterization of *Saccharomyces cerevisiae* kha1 deletion mutants. *Mol Microbiol* 55, 588-600.
- Marston, A.L., Chen, T., Yang, M.C., Belhumeur, P., and Chant, J. (2001). A localized GTPase exchange factor, Bud5, determines the orientation of division axes in yeast. *Curr Biol* 11, 803-807.



- Marzioch, M., Henthorn, D.C., Herrmann, J.M., Wilson, R., Thomas, D.Y., Bergeron, J.J., Solari, R.C., and Rowley, A. (1999). Erp1p and Erp2p, partners for Emp24p and Erv25p in a yeast p24 complex. *Mol Biol Cell* 10, 1923-1938.
- Merzendorfer, H. (2011). The cellular basis of chitin synthesis in fungi and insects: common principles and differences. *Eur J Cell Biol* 90, 759-769.
- Miller, E., Antonny, B., Hamamoto, S., and Schekman, R. (2002). Cargo selection into COPII vesicles is driven by the Sec24p subunit. *EMBO J* 21, 6105-6113.
- Miller, E.A., Beilharz, T.H., Malkus, P.N., Lee, M.C., Hamamoto, S., Orci, L., and Schekman, R. (2003). Multiple cargo binding sites on the COPII subunit Sec24p ensure capture of diverse membrane proteins into transport vesicles. *Cell* 114, 497-509.
- Miller, P.J., and Johnson, D.I. (1994). Cdc42p GTPase is involved in controlling polarized cell growth in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* 14, 1075-1083.
- Mitsui, K., Yasui, H., Nakamura, N., and Kanazawa, H. (2005). Oligomerization of the *Saccharomyces cerevisiae* Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter Nha1p: implications for its antiporter activity. *Biochim Biophys Acta* 1720, 125-136.
- Moreno-Borchart, A.C., Strasser, K., Finkbeiner, M.G., Shevchenko, A., Shevchenko, A., and Knop, M. (2001). Prospore membrane formation linked to the leading edge protein (LEP) coat assembly. *EMBO J* 20, 6946-6957.
- Mossessova, E., Bickford, L.C., and Goldberg, J. (2003). SNARE selectivity of the COPII coat. *Cell* 114, 483-495.
- Muniz, M., Nuoffer, C., Hauri, H.P., and Riezman, H. (2000). The Emp24 complex recruits a specific cargo molecule into endoplasmic reticulum-derived vesicles. *J Cell Biol* 148, 925-930.
- Nakanishi, H., Morishita, M., Schwartz, C.L., Coluccio, A., Engebrecht, J., and Neiman, A.M. (2006). Phospholipase D and the SNARE Sso1p are necessary for vesicle fusion during sporulation in yeast. *J Cell Sci* 119, 1406-1415.
- Nakanishi, H., Suda, Y., and Neiman, A.M. (2007). Erv14 family cargo receptors are necessary for ER exit during sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* 120, 908-916.
- Nass, R., Cunningham, K.W., and Rao, R. (1997). Intracellular sequestration of sodium by a novel Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in yeast is enhanced by mutations in the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. Insights into mechanisms of sodium tolerance. *J Biol Chem* 272, 26145-26152.
- Nass, R., and Rao, R. (1998). Novel localization of a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in an endosomal compartment of yeast. Implications for vacuole biogenesis. *J Biol Chem* 273, 21054-21060.
- Navarrete, C., Petrezselyova, S., Barreto, L., Martinez, J.L., Zahradka, J., Arino, J., Sychrova, H., and Ramos, J. (2010). Lack of main K<sup>+</sup> uptake systems in *Saccharomyces cerevisiae* cells affects yeast performance in both potassium-sufficient and potassium-limiting conditions. *FEMS Yeast Res* 10, 508-517.
- Neiman, A.M. (2011). Sporulation in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 189, 737-765.
- Noda, Y., Hara, T., Ishii, M., and Yoda, K. (2014). Distinct adaptor proteins assist exit of Kre2-family proteins from the yeast ER. *Biol Open* 3, 209-224.

- Noda, Y., and Yoda, K. (2010). Svp26 facilitates endoplasmic reticulum to golgi transport of a set of mannosyltransferases in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 285, 15420-15429.
- Novick, P., Ferro, S., and Schekman, R. (1981). Order of events in the yeast secretory pathway. *Cell* 25, 461-469.
- Novick, P., Field, C., and Schekman, R. (1980). Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell* 21, 205-215.
- Novick, P., and Schekman, R. (1979). Secretion and cell-surface growth are blocked in a temperature-sensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 1858-1862.
- Nuoffer, C., Jenö, P., Conzelmann, A., and Riezman, H. (1991). Determinants for glycosphospholipid anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* Gas1 protein to the plasma membrane. *Mol Cell Biol* 11, 27-37.
- Otte, S., Belden, W.J., Heidtman, M., Liu, J., Jensen, O.N., and Barlowe, C. (2001). Erv41p and Erv46p: new components of COPII vesicles involved in transport between the ER and Golgi complex. *J Cell Biol* 152, 503-518.
- Pagant, S., Kung, L., Dorrington, M., Lee, M.C., and Miller, E.A. (2007). Inhibiting endoplasmic reticulum (ER)-associated degradation of misfolded Yor1p does not permit ER export despite the presence of a diacidic sorting signal. *Mol Biol Cell* 18, 3398-3413.
- Pagant, S., Wu, A., Edwards, S., Diehl, F., and Miller, E.A. (2015). Sec24 is a coincidence detector that simultaneously binds two signals to drive ER export. *Curr Biol* 25, 403-412.
- Park, H.O., and Bi, E. (2007). Central roles of small GTPases in the development of cell polarity in yeast and beyond. *Microbiol Mol Biol Rev* 71, 48-96.
- Park, H.O., Bi, E., Pringle, J.R., and Herskowitz, I. (1997). Two active states of the Ras-related Bud1/Rsr1 protein bind to different effectors to determine yeast cell polarity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 4463-4468.
- Park, H.O., Chant, J., and Herskowitz, I. (1993). *BUD2* encodes a GTPase-activating protein for Bud1/Rsr1 necessary for proper bud-site selection in yeast. *Nature* 365, 269-274.
- Persson, B.L., Berhe, A., Fristedt, U., Martinez, P., Pattison, J., Petersson, J., and Weinander, R. (1998). Phosphate permeases of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1365, 23-30.
- Powers, J., and Barlowe, C. (1998). Transport of Axl2p depends on Erv14p, an ER-vesicle protein related to the *Drosophila cornichon* gene product. *J Cell Biol* 142, 1209-1222.
- Powers, J., and Barlowe, C. (2002). Erv14p directs a transmembrane secretory protein into COPII-coated transport vesicles. *Mol Biol Cell* 13, 880-891.
- Prior, C., Potier, S., Souciet, J.L., and Sychrova, H. (1996). Characterization of the *NHA1* gene encoding a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiporter of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 387, 89-93.
- Rabitsch, K.P., Toth, A., Galova, M., Schleiffer, A., Schaffner, G., Aigner, E., Rupp, C., Penkner, A.M., Moreno-Borchart, A.C., Primig, M., et al. (2001). A screen for genes required for meiosis and spore formation based on whole-genome expression. *Curr Biol* 11, 1001-1009.
- Ramirez, J., Ramirez, O., Saldana, C., Coria, R., and Pena, A. (1998). A *Saccharomyces cerevisiae* mutant lacking a K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. *J Bacteriol* 180, 5860-5865.

- Roberg, K.J., Crotwell, M., Espenshade, P., Gimeno, R., and Kaiser, C.A. (1999). *LST1* is a *SEC24* homologue used for selective export of the plasma membrane ATPase from the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 145, 659-672.
- Roemer, T., Madden, K., Chang, J., and Snyder, M. (1996). Selection of axial growth sites in yeast requires Axl2p, a novel plasma membrane glycoprotein. *Genes Dev* 10, 777-793.
- Rosas-Santiago, P., Lagunas-Gomez, D., Barkla, B.J., Vera-Estrella, R., Lalonde, S., Jones, A., Frommer, W.B., Zimmermannova, O., Sychrova, H., and Pantoja, O. (2015). Identification of rice cornichon as a possible cargo receptor for the Golgi-localized sodium transporter *OsHKT1;3*. *J Exp Bot* 66, 2733-2748.
- Rosas-Santiago, P., Zimmermannova, O., Vera-Estrella, R., Sychrova, H., and Pantoja, O. (2016). Erv14 cargo receptor participates in yeast salt tolerance via its interaction with the plasma-membrane Nha1 cation/proton antiporter. *Biochim Biophys Acta* 1858, 67-74.
- Roth, S., Neuman-Silberberg, F.S., Barcelo, G., and Schupbach, T. (1995). *Cornichon* and the EGF receptor signaling process are necessary for both anterior-posterior and dorsal-ventral pattern formation in *Drosophila*. *Cell* 81, 967-978.
- Sacristan, C., Manzano-Lopez, J., Reyes, A., Spang, A., Muniz, M., and Roncero, C. (2013). Oligomerization of the chitin synthase Chs3 is monitored at the Golgi and affects its endocytic recycling. *Mol Microbiol* 90, 252-266.
- Sato, K. (2004). COPII coat assembly and selective export from the endoplasmic reticulum. *J Biochem* 136, 755-760.
- Sato, K., and Nakano, A. (2002). Emp47p and its close homolog Emp46p have a tyrosine-containing endoplasmic reticulum exit signal and function in glycoprotein secretion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell* 13, 2518-2532.
- Sburlati, A., and Cabib, E. (1986). Chitin synthetase 2, a presumptive participant in septum formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 261, 15147-15152.
- Serrano, R., Kielland-Brandt, M.C., and Fink, G.R. (1986). Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>), K<sup>+</sup>- and Ca<sup>2+</sup>-ATPases. *Nature* 319, 689-693.
- Sharpe, H.J., Stevens, T.J., and Munro, S. (2010). A comprehensive comparison of transmembrane domains reveals organelle-specific properties. *Cell* 142, 158-169.
- Shaw, J.A., Mol, P.C., Bowers, B., Silverman, S.J., Valdivieso, M.H., Duran, A., and Cabib, E. (1991). The function of chitin synthases 2 and 3 in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *J Cell Biol* 114, 111-123.
- Sherwood, P.W., and Carlson, M. (1999). Efficient export of the glucose transporter Hxt1p from the endoplasmic reticulum requires Gsf2p. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 7415-7420.
- Shcherbik, N. (2013). Golgi-mediated glycosylation determines residency of the T2 RNase Rny1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Traffic* 14, 1209-1227.
- Schimmoller, F., Singer-Kruger, B., Schroder, S., Kruger, U., Barlowe, C., and Riezman, H. (1995). The absence of Emp24p, a component of ER-derived COPII-coated vesicles, causes a defect in transport of selected proteins to the Golgi. *EMBO J* 14, 1329-1339.

Schwenk, J., Harmel, N., Zolles, G., Bildl, W., Kulik, A., Heimrich, B., Chisaka, O., Jonas, P., Schulte, U., Fakler, B., et al. (2009). Functional proteomics identify cornichon proteins as auxiliary subunits of AMPA receptors. *Science* 323, 1313-1319.

Silverman, S.J., Sburlati, A., Slater, M.L., and Cabib, E. (1988). Chitin synthase 2 is essential for septum formation and cell division in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 4735-4739.

Trilla, J.A., Duran, A., and Roncero, C. (1999). Chs7p, a new protein involved in the control of protein export from the endoplasmic reticulum that is specifically engaged in the regulation of chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 145, 1153-1163.

Utku, N., Bulwin, G.C., Beinke, S., Heinemann, T., Beato, F., Randall, J., Schnieders, B., Sandhoff, K., Volk, H.D., Milford, E., et al. (1999). The human homolog of *Drosophila cornichon* protein is differentially expressed in alloactivated T-cells. *Biochim Biophys Acta* 1449, 203-210.

Valdivieso, M.H., Mol, P.C., Shaw, J.A., Cabib, E., and Duran, A. (1991). *CAL1*, a gene required for activity of chitin synthase 3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 114, 101-109.

von Heijne, G., and Gavel, Y. (1988). Topogenic signals in integral membrane proteins. *Eur J Biochem* 174, 671-678.

Yoshihisa, T., Barlowe, C., and Schekman, R. (1993). Requirement for a GTPase-activating protein in vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Science* 259, 1466-1468.